

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59-227744

⑤Int. Cl.³
C 03 C 23/00
// C 12 P 19/34

識別記号

庁内整理番号
8017-4G
7258-4B

③公開 昭和59年(1984)12月21日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑤ DNA回収用ガラス粉粒物

①特 願 昭58-102435

②出 願 昭58(1983)6月8日

③発 明 者 安江博
名古屋市千種区田代町鹿子殿81
番地の1159県公舎A2-2

④発 明 者 服部三良

名古屋市守山区大森字元郷983
の3

④出 願 人 理科研株式会社

名古屋市守山区大森字元郷983
番地の3

④代 理 人 弁理士 入山宏正

明 細 書

1. 発明の名称

DNA回収用ガラス粉粒物

2. 特許請求の範囲

1 濃硫酸及び濃硝酸処理をした後、純水で充分に洗浄し、次いで低沸点アルコール処理をして乾燥した、平均粒径3〜50μmのDNA回収用ガラス粉粒物。

2 平均粒径が5〜10μmである特許請求の範囲第1項記載のDNA回収用ガラス粉粒物。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、DNA回収用ガラス粉粒物、更に詳しくはDNAを含むアガロースゲルから該DNAを簡易且つ高率にそして高分子のDNAでもこれを損なうことなく回収し、回収DNAのその後の酵素処理等各種展開に極めて有利なDNA回収用ガラス粉粒物に関する。

従来、DNAを含むアガロースゲルから該DNAを回収する場合、低沸点アルコールを用いる手段やアガロースを破砕して自然拡散する手段、更

には電気泳動による手段等が行なわれている。

ところが、これらの従来手段によると、単に回収操作が煩雑且つ面倒であるというだけでなく、回収率が最大60%程度といわれているものの、実際のところは30〜40%と低く、また高分子のDNAは回収途中において損なわれることも多く、更にその性質上回収DNAの濃度が低くなって、該回収DNAのその後の酵素処理等各種展開をするには加えて厄介な濃縮操作等を強いられること等、多くの欠点がある。

本発明者らは、以上の如き実情に鑑み、従来欠点を解消するべく、アガロースゲルに含まれる貴重なDNAの新たな回収手段について鋭意研究した結果、特定のガラス粉粒物を使用すると、所望通りDNAが該ガラス粉粒物に付着回収されることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、濃硫酸及び濃硝酸処理をした後、純水で充分に洗浄し、次いで低沸点アルコール処理をして乾燥した、平均粒径3〜50μmのDNA回収用ガラス粉粒物に関する。

以下、本発明の構成を詳細に説明する。

本発明において対象となるガラス粉粒物は、その材質に特に制限はない。しかし、所謂低カリガラスが好ましい。アルカリガラスや鉛ガラス等も後述するような処理を行えば使用可能ではあるが、回収DNAの酵素処理等に弊害を生じるおそれがあるため、避けた方がよい。そして、該ガラス粉粒物は、平均粒径3～50μmのものを対象とする。これらは、沈降分離法、例えば水洗沈降分離法で分別できるが、平均粒径3μm未満のものは事実上分別が困難であり、また平均粒径50μmを超えるものはDNAの回収効率が悪い。平均粒径5～10μmのものを使用対象とすると、所望の効果が安定発揮され、本発明の目的に照らして一層好適である。ガラス粉粒物の分別は、例えば東芝パロティーニ社製のEgBタイプ37μm以下のものを用いて水洗沈降分離法で容易にえられるが、これは後述する処理の前、処理の後又は処理中のいずれの段階で行なってもよい。但し、純水洗浄後低沸点アルコール処理前の段階で行なうのが好ましい。

5倍容量の濃塩酸に入れ、要すれば若干の加熱をしつつ、3～5時間程度静かに攪拌する。この場合、室温静置であってもよい。そして、濃塩酸を切り、再び新たな濃塩酸を同様に加えて処理する。このような操作を3回程度繰り返した後、水洗浄して塩酸成分を除去する。次いで、濃塩酸処理と同様に濃硝酸処理を行なう。一応の目安として、硝酸溶液が着色しないようになるまで行なう。

次に、純水（精製水、蒸留水）でガラス粉粒物を洗浄する。例えば、前述の如く濃硝酸処理した後、濃硝酸を切り、上澄液がpH5～7程度になるまで純水で洗浄して、硝酸成分等を除去する。粒径分別されていないガラス粉粒物を対象とした場合には、この段階で分別するのがよい。前述の如き酸処理等におけるガラス粉粒物の予期せぬ破砕や、後述の如き低沸点アルコール処理後における不意な有機成分の付着等による悪影響を安全排除するためである。具体的に分別は、例えば、前述の如く純水洗浄したものから、水（純水）沈

かかるガラス粉粒物を次のように処理する。本発明者らは、本発明完成過程において、簡単な純水洗浄以外には特に何らの処理もすることなく、各種（材質、平均粒径）のガラス粉粒物を用いてDNA回収試験を行なった。その結果、少なくとも従来手段に比べ、DNAの回収操作や回収率は著るしく向上した。しかし、回収DNAを用いてその後の利用展開である例えば酵素処理をしようと、予期し得ない程度に不規則な酵素活性阻害が頻繁に発生した。しかして本発明者らは、その原因を追究すると、回収操作段階において使用したガラス粉粒物とともに持ち込まれる金属類によることが判った。DNA回収操作や回収率の向上に加えて、回収DNAのその後の利用展開に安定と便宜を供するには、ガラス粉粒物を次のように処理することが肝要である。

先ず、ガラス粉粒物を濃塩酸及び濃硝酸処理する。これらは別々に行なっても又は同時に行なってもよいが、操作の安全を期するため、別々に行なう方がよい。例えば、ガラス粉粒物をその4～

5倍容量の濃塩酸で、平均粒径3～50μm、好ましくは5～10μmのガラス粉粒物を得る。

最後に、ガラス粉粒物を低沸点アルコール処理して乾燥する。例えば、前述の如く純水で洗浄した後（更に要すれば別した後）、純水を切り、メチルアルコールやエチルアルコールの如き低沸点アルコールを用いて、前述した酸処理と同様にガラス粉粒物を処理する。ガラス粉粒物に付着していることのある有機成分を除去し、同時にガラス粉粒物を乾燥し易くしてから、常法により乾燥する。

かくして得られるDNA回収用ガラス粉粒物は、これを用いてDNAを含むアガロースゲルから該DNAを付着回収するに、操作が簡単で、回収率が75%以上と高く、0.2～1.9KBの範囲のDNAを損なうことなく回収でき、しかも回収DNAの多方面への利用展開がし易く、例えばその酵素処理において悪影響が全くない。

・実施例

ガラス粉粒物（東芝パロティーニ社製、EgB 7

イブ、 3.7μ 以下)に、該ガラス粉粒物の5倍容量の濃塩酸を加えて室温で静かに3時間攪拌した後、濃塩酸を切る、という操作を3回繰り返し、水洗浄して塩酸成分を除去した。このガラス粉粒物に濃塩酸処理と同様の濃硝酸処理を3回繰り返し、濃硝酸を切ってから、上澄液のpH6になるまで蒸留水で繰り返し洗浄した。洗浄したガラス粉粒物を、蒸留水で水洗降分離し、平均粒径 $5\sim 10\mu$ のものを分別した。そして、分別後のガラス粉粒物に、その5倍容量のエチルアルコールを加えて室温で静かに3時間攪拌した後、エチルアルコールを切る、という操作を2回繰り返し、室温で真空乾燥して、本発明に係るDNA回収用ガラス粉粒物を得た。

得られたガラス粉粒物を用いてDNAの回収試験を次のように行なった。10KBのDNA 0.17 μ gを含む0.7 μ アガロースゲルに、ガラス粉粒物10 μ gと飽和ヨウ化ナトリウム水溶液(10mMの亜硫酸ナトリウムを含む)0.4 ml を加え、室温で4時間、ゆっくりと振盪した後、10000G

$\times 5$ 分で遠心分離して上液を廃棄した。これに、70%(W/V)ヨウ化ナトリウム水溶液1 ml を加えて室温で1時間ゆっくりと振盪した後、10000G $\times 5$ 分で遠心分離して上液を廃棄する、という操作を3回繰り返し、引き続き、エチルアルコール1 ml を加えて室温で1時間ゆっくりと振盪した後、10000G $\times 5$ 分で遠心分離して上液を廃棄する、という操作を3回繰り返し、そして、以上の如く処理したものを室温で真空乾燥し、DNAの付着したガラス粉粒物を得た。この乾燥したガラス粉粒物に、蒸留水0.15 ml を加えて $37^{\circ}C \times 30$ 分間静置した後、10000G $\times 5$ 分で遠心分離して上液を回収する、という操作を2回繰り返し、合わせた上液中に回収されたDNAは、何ら損なわれておらず、放射性同位元素を用いてのその回収率は85.6%の高率であり、その酵素処理等展開利用は極めて円滑であった。

特許出願人 理科研株式会社

代理人 弁理士 入山安正

GRANULAR AND POWDERY GLASS FOR RECOVERING DNA**Publication number:** JP59227744**Publication date:** 1984-12-21**Inventor:** YASUE HIROSHI; HATSUTORI SABUROU**Applicant:** RIKAKEN KK**Classification:****- International:** C03C23/00; C12P19/34; C03C23/00; C12P19/00;
(IPC1-7): C12P19/34**- European:****Application number:** JP19830102435 19830608**Priority number(s):** JP19830102435 19830608[Report a data error here](#)**Abstract of JP59227744**

PURPOSE: To obtain a granular or powdery glass for recovering DNA, by treating a granular or powdery glass having a specific grain or particle diameter with concentrated hydrochloric acid and nitric acid, washing the treated granular or powdery glass fully with pure water, and treating the washed glass with a low-boiling alcohol, and drying the resultant glass. **CONSTITUTION:** Glass is pulverized to give a granular or powdery glass having 3-50 microns, preferably 5-10 microns average grain or particle diameter, which is then treated with concentrated hydrochloric acid and nitric acid and washed fully with pure water. The washed granular or powdery glass is further treated with a low-boiling alcohol, e.g. methyl alcohol or ethyl alcohol, to remove sticking organic components, and the resultant granular or powdery glass is then dried. The resultant granular or powdery glass is capable of recovering DNA easily from agarose gel containing the DNA in high yield.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide